

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS

ESCUELA DE AGRONOMÍA

Memoria de Título

**ESTUDIOS DE PATOGENICIDAD Y DETECCIÓN MEDIANTE PCR DE
VERTICILLIUM ALBO-ATRUM REINKE & BERTH., EN KIWI DORADO
(*ACTINIDIA CHINENSIS* PLANCH) CULTIVAR HORT16A**

MAURICIO ALEJANDRO RUBILAR RUBILAR

Santiago, Chile

2010

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS

ESCUELA DE AGRONOMÍA

Memoria de Título

**ESTUDIOS DE PATOGENICIDAD Y DETECCIÓN MEDIANTE PCR DE
VERTICILLIUM ALBO-ATRUM REINKE & BERTH. EN KIWI DORADO
(*ACTINIDIA CHINENSIS* PLANCH) CULTIVAR HORT16A**

**PATHOGENICITY TEST AND PCR DETECTION OF *VERTICILLIUM ALBO-
ATRUM* REINKE & BERTH. ON GOLD KIWIFRUIT (*ACTINIDIA CHINENSIS*
PLANCH) CULTIVAR HORT16A**

MAURICIO ALEJANDRO RUBILAR RUBILAR

Santiago, Chile

2010

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
ESCUELA DE AGRONOMÍA

**ESTUDIOS DE PATOGENICIDAD Y DETECCIÓN MEDIANTE PCR DE
VERTICILLIUM ALBO-ATRUM REINKE & BERTH., EN KIWI DORADO
(*ACTINIDIA CHINENSIS* PLANCH) CULTIVAR HORT16A**

Memoria para optar al título profesional de:
Ingeniero Agrónomo

MAURICIO ALEJANDRO RUBILAR RUBILAR

Profesores Guías	Calificaciones
Sr. Jaime Auger S. Ingeniero Agrónomo, M.S. Ph.D.	6,8
Sra. Marcela Esterio G. Ingeniero Agrónomo, M.Sc.	6,8
Profesores Evaluadores	
Sr. Jaime R. Montealegre A. Ingeniero Agrónomo.	7,0
Sr. José Luis Henríquez S Ingeniero Agrónomo, M.S. Ph. D.	6,7

Santiago, Chile

2010

AGRADECIMIENTOS

Deseo agradecer particularmente a:

A mi madre y mi familia que siempre me han apoyado irrestrictamente en todo, aunque no necesariamente compartan siempre mi opinión en las decisiones que he tomado.

Al profesor Jaime Auger por su gran apoyo, ayuda, consejos y sabiduría en la realización de esta memoria y a la profesora Marcela Esterio por su constante ayuda e interés en la finalización de este trabajo.

A mis compañeras y compañeros del laboratorio de Fitopatología Molecular y Frutal por su gran ayuda y paciencia conmigo, además de momentos de diversión que compartimos.

Por ultimo agradezco a mis amigas y amigos más cercanos por su ayuda, consejos, extensas conversaciones y salidas que hemos compartido a través de estos años.

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
Hipótesis	7
Objetivo general	7
MATERIALES Y MÉTODO	8
Lugar del estudio	8
Materiales y reactivos	8
Medios de cultivo	8
Inoculación artificial de plantas	8
Identificación y caracterización morfológica	8
Aislamiento y cultivo del material fúngico	9
Extracción de ADN	9
Amplificación de ADN	9
Método	10
Aislamiento y caracterización morfológica	10
Aislamiento del agente fungoso asociado a plantas enfermas	10
Identificación del agente causal	10
Prueba de patogenicidad	10
Inoculación artificial	10
Aislamiento y cultivo del material fúngico	10
Identificación molecular	11
Obtención de biomasa fungosa	11
Extracción de ADN desde micelio	11
Obtención y extracción de ADN desde tejido vegetal	11
Amplificación de ADN	12
Comparación entre <i>V. albo-atrum</i> y <i>V. dahliae</i>	13
Diseño experimental y análisis estadístico	14

RESULTADOS Y DISCUSIÓN	15
Aislamiento e identificación	15
Prueba de patogenicidad	15
Recuperación e identificación del patógeno	16
Identificación molecular	17
Comparación entre <i>V. albo-atrum</i> y <i>V. dahliae</i>	19
Diferencias morfológicas	19
Tamaño de conidias	20
Tamaño de fialides	20
Efecto de la temperatura	21
CONCLUSIONES	24
BIBLIOGRAFÍA CITADA	25
APÉNDICES	31

RESUMEN

El presente estudio se realizó con el objetivo de comprobar la patogenicidad de *Verticillium albo-atrum*, hongo asociado al decaimiento y muerte de plantas de kiwi dorado (*Actinidia chinensis*) cultivar Hort16A. Con este propósito plantas de Hort16A de un año de edad injertadas sobre Hayward (*Actinidia deliciosa*) se inocularon con una suspensión conidial de 10^6 conidias·ml⁻¹. Al cabo de sesenta días, solamente las plantas inoculadas con *V. albo-atrum* manifestaron síntomas de clorosis, marchitez y defoliación. Desde plantas con síntomas se recuperó en medio de cultivo Agar Agua y Agar Papa Dextrosa a *V. albo-atrum*, identificado morfológicamente y mediante la amplificación del espacio intergénico entre los genes 18S y 28S que codifican para el RNA ribosomal del micelio del hongo. Desde tejido vegetal de plantas de kiwi dorado con síntomas se comprobó la presencia de *V. albo-atrum* utilizando la técnica de PCR anidado.

Se realizó un estudio comparativo de la morfología y temperatura óptima de desarrollo entre *V. albo-atrum* y *V. dahliae*. Destacándose como la principal diferencia morfológica la presencia de hifas melanizadas en *V. albo-atrum* y la formación de microesclerocios en *V. dahliae*. La temperatura óptima de crecimiento para *V. albo-atrum* fue de 20°C y de 25°C para *V. dahliae*.

Palabras claves: ADN, morfología, marchitez, hifas melanizadas, temperatura óptima.

ABSTRACT

The objective of this study was to verify the pathogenicity of *Verticillium albo-atrum*, fungi associated with decline and death of gold kiwifruit (*Actinidia chinensis*) cultivar Hort16A. For this purpose Hort16A plants of one year old grafted on Hayward (*Actinidia deliciosa*) were inoculated with a suspension of 10^6 conidias·ml⁻¹. After sixty days, only plants inoculated with *V. albo-atrum* showed symptoms of chlorosis, wilting and defoliation. The isolated fungus from symptomatic plant was recovered in water agar and potato dextrose agar medium and identified morphologically and by amplification of intergenic space between rRNA 18S and 28S coding genes of *V. albo-atrum* mycelium. From symptomatic plants tissue was detected the presence of *V. albo-atrum* using nested PCR.

It was performed a comparative study of morphology and optimum temperature growth between *V. albo-atrum* and *V. dahliae*, being the main morphological difference the presence of melanized hiphae on *V. albo-atrum* and of microesclerotia on *V. dahliae*. The optimum growth temperature of *V. albo-atrum* and *V. dahliae* were 20°C and 25°C respectively.

Keywords: DNA, morphology, Wilting, melanized hiphae, optimum temperature.

INTRODUCCIÓN

En Chile la fruticultura ha experimentado en los últimos años un cambio de cultivares y especies frutales, principalmente por el aumento en los costos de producción y el menor retorno. Como consecuencia de lo anterior, entre los frutales que han variado su superficie plantada se encuentra el kiwi (*Actinidia deliciosa* Chevalier).

De acuerdo a FAO, la superficie mundial plantada de kiwi en 2008 era de 82.258 hectáreas, con una producción total de 1.308.424 toneladas, siendo Italia y Nueva Zelanda los principales países productores. La participación de Chile como productor mundial corresponde a un 13% del volumen total, convirtiéndose de esta forma en el tercer productor de kiwi (FAO, 2010).

En el año 2009 Chile exportó 182.770,8 toneladas de kiwi, siendo Italia y EE.UU los principales destinos, logrando un aumento de un 14% en la producción, pero obteniendo menores utilidades respecto al año anterior (ODEPA, 2010a).

Actualmente la superficie total de kiwi es de 10.769 hectáreas, concentrándose preferentemente entre las regiones Metropolitana y VII, siendo Hayward el principal cultivar en producción (ODEPA, 2010b). De la superficie total de kiwi, sólo 140 hectáreas (año 2003) corresponden a kiwi dorado (*Actinidia chinensis* Planch) cultivar Hort16A, cuya licencia pertenece a Zespri, Nueva Zelanda.

El cultivar Hort16A se caracteriza por ser una planta muy vigorosa y que generalmente se injerta sobre patrón Hayward o Bruno, presentando una brotación y floración entre 3 a 4 semanas antes que Hayward y una cosecha posterior. El rendimiento alcanzado por el cultivar Hort16A oscila entre 30 y 36 ton/ha promedio, muy superior a la producción que alcanza Hayward (18 ton/ha) (Patterson *et al.*, 2003; FAO, 2010).

Las especies del género *Actinidia* son en general bastante sanas, produciéndose en algunos huertos orgánicamente. Sin embargo, la introducción y propagación de material infectado desde vivero o por establecimiento en suelo de replante contaminado, favorece la infección por hongos del suelo y posterior pérdida de plantas.

Durante los últimos años se han observado grandes pérdidas por decaimiento y muerte de plantas en huertos nuevos de kiwi dorado cultivar Hort16A, tanto en la Región Metropolitana como en la VI Región, lo cual ha reducido significativamente la superficie de Hort16A a solo 4,03 hectáreas (ODEPA, 2010c). Asociado a plantas afectadas con síntomas de marchitez y muerte parcial, se ha recuperado e identificado en forma consistente a *Verticillium albo-atrum* (Auger *et al.*, 2009a; Auger *et al.*, 2009b).

La identificación de *Verticillium* spp. se basa en el tipo de estructura de sobrevivencia que presenta, tales como: micelio pigmentado, microesclerocios pigmentados o clamidosporas

(Pegg y Brady, 2002; Klosterman *et al.*, 2009). *Verticillium dahliae* Klebahn se caracteriza por producir microesclerocios melanizado como estructura de sobrevivencia, mientras que *V. albo-atrum* presenta hifas melanizadas (micelio en latencia) y ausencia de microesclerocios (Talboys, 1960; Isaac, 1967; Pegg y Brady, 2002). Otra forma de distinguir *V. dahliae* de *V. albo-atrum* es la temperatura óptima de crecimiento de las estructuras de sobrevivencia y el grado de germinación conidial (Lachquer y Sedra, 2002), además del desarrollo del patógeno en medio de cultivo “Talboys” (Talboys, 1960). Cuando no es posible diferenciar morfológicamente a *Verticillium* spp., la forma más adecuada de identificación es mediante métodos moleculares (Barbara y Clewes, 2003; EPPO, 2007).

De acuerdo a Pegg y Brady (2002) la temperatura es el factor ambiental más importante, afectando no sólo la germinación conidial de *Verticillium* spp. y el desarrollo de la enfermedad, sino que también la distribución geográfica de *V. albo-atrum* y *V. dahliae*. *V. dahliae* se encuentra principalmente en condiciones de climas templados y suelos delgados, detectándose su presencia principalmente en EE.UU, Canadá e Israel; en cambio, *V. albo-atrum* se desarrolla preferentemente en climas fríos de ambientes húmedos y lluviosos de suelos pesados, típicos del Noreste de Europa, Este de Canadá y EE.UU (Pegg and Brady, 2002). Por el contrario EPPO (2003) indica que *V. albo-atrum* predomina en zonas templadas y *V. dahliae* se asocia más a áreas tropicales y subtropicales.

Verticillium spp. se caracteriza por sobrevivir como micelio en el suelo, en el interior de plantas perennes, en órganos de propagación (bulbos, tubérculos o semillas) o bien en residuos de plantas enfermas (Fradin y Thomma, 2006; Qin *et al.*, 2006).

La penetración y establecimiento de la infección se produce en la mayoría de los hospederos a los 4 días (Pegg y Brady, 2002). Cuando el patógeno coloniza el sistema vascular de tallos y raíces, provoca marchitez en los tejidos afectados (Qin *et al.*, 2006). Generalmente la propagación del patógeno ocurre mediante la utilización de herramientas contaminadas, suelo contaminado, riego y uso de material de propagación infectado en vivero (Hoitink y Krause, 1999; Fradin y Thomma, 2006). Sin embargo, Isaac (1953) considera que el contacto raíz-raíz es la forma más común y rápida de propagar *Verticillium* spp. La infección de raíces por parásitos, como nematodos, puede intensificar la incidencia y severidad de enfermedades causadas por hongos del suelo, ya que los nematodos producen heridas en el sistema radical, ocasionando de esta forma un sitio potencial de penetración. Estas heridas, al incrementar la cantidad de exudados radicales, atraen a los patógenos, estimulando de este modo la germinación conidial (Fradin y Thomma, 2006).

Nematodos tanto endoparásitos (*Globodera* spp., *Heterodera* spp., *Rotylenchulus* spp. y *Pratylenchus* spp.), como ectoparásitos (*Xiphinema* spp. y *Longidorus* spp.) han sido asociados al desarrollo de enfermedades por hongos del suelo (Back *et al.*, 2002). De acuerdo a estudios realizados por Mckeen y Mountain (1960) y Jacobsen *et al.* (1979) al asociarse *V. albo-atrum* con los nematodos *Meloidogyne hapla* o *Pratylenchus penetrans* se produce una relación sinérgica en la severidad de la enfermedad en plantas de berenjena (*Solanum melongena* L.). En papa (*Solanum tuberosum* L.) la asociación entre los

nematodos *Pratylenchus* spp. y *Globodera* spp. y *V. dahliae* ha provocado importantes daños (Back *et al.*, 2002). También en cultivos de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) y menta (*Mentha × piperita* L.) se han observado asociaciones entre *Verticillium* spp. y *Pratylenchus* spp. (Jacobsen *et al.*, 1979).

A diferencia de *V. dahliae* que afecta un amplio rango de plantas hospederas como pimiento (*Capsicum annuum* L.), papa, tomate, vides (*Vitis vinífera* L.), olivo (*Olea europaea* L.) y frutilla (*Fragaria x annanasa* Duchesne) entre otros, *V. albo-atrum* en cambio, presenta un menor rango de hospederos, siendo principalmente patógeno de alfalfa (*Medicago sativa* L.), lúpulo (*Humulus lupulus* L.), haba (*Vicia faba* L.), tomate y papa (Fradin y Thomma, 2006).

El patrón general de síntomas encontrados en la mayoría de los hospederos herbáceos y leñosos, corresponde a una pérdida parcial o total de turgor y a una clorosis, marchitez y necrosis (Pegg y Brady, 2002; Fradin y Thomma, 2006). Asociado con estos síntomas y dependiendo de la edad y hospedero, puede ocurrir un menor crecimiento y desarrollo de la planta (Pegg y Brady, 2002). En lúpulo, por ejemplo, se observa un engrosamiento del tejido, rugosidad de la epidermis y decoloración del sistema vascular, disminuyendo la producción y provocando eventualmente la muerte de las plantas afectadas (Otero *et al.*, 2004; EPPO, 2007).

En varias especies vegetales, la marchitez de brotes jóvenes puede ocurrir durante períodos cálidos del día y la planta se recupera durante la noche, por lo tanto es difícil de diagnosticar basándose únicamente en la expresión de síntomas (Fradin y Thomma, 2006).

La utilización de material de propagación sano, el establecimiento de huertos en suelos libres del patógeno, la remoción de plantas afectadas y uso de cultivares resistentes, son las principales medidas de control (Morera *et al.*, 2005; Fradin y Thomma, 2006). El uso de patrones resistentes en plantas de olivo y vides ha sido descrito como el mejor método de control contra *V. dahliae* (Cirulli, 1975). Otras alternativas de control son la solarización, fumigación química del suelo o la rotación de cultivos, sin embargo, tales medidas resultan poco eficientes al momento de implementarlas, debido principalmente a la duración de éstas y a la viabilidad de las estructuras de resistencia del patógeno (Huisman y Ashworth, 1976; Fradin y Thomma, 2006). Como alternativas de manejo, actualmente se encuentran en desarrollo programas de control basados en la incorporación de biocontroladores, como patógenos antagónicos, micorrizas, rizobacterias antagónicas, en combinación con aplicaciones de nitrógeno o enmiendas orgánicas al suelo (Fradin y Thomma, 2006). Berbegal *et al.* (2008) obtuvieron bajos niveles de inóculo al tratar el suelo con enmiendas químicas y residuos de coliflor (*Brassica oleracea* L. var. *botrytis* L.). Por otra parte, rotaciones con brócoli (*Brassica oleracea* L. var. *italica* Plenck) en cultivos de frutilla, han reducido las poblaciones de *Verticillium* ssp. presentes en el suelo (Subbarao *et al.*, 2007; Njoroge *et al.*, 2009).

Es por eso, que la temprana, rápida y precisa detección e identificación del patógeno en plantas o suelo, es esencial para reducir el riesgo de propagación, especialmente cuando

éste tiene un amplio rango de hospederos (Schena *et al.*, 2004). La detección de *V. albo-atrum* en los tejidos de la planta se puede realizar desde la raíz hasta la parte superior del sistema vascular. Un corte en la sección transversal del tallo, revela frecuentemente un pardeamiento del tejido, incluso cuando los síntomas externos aún no se han presentado (EPPO, 2007).

En la actualidad, diversas técnicas moleculares están siendo utilizadas para la detección, monitoreo, cuantificación y estimación de la densidad de propágulos de *Verticillium* spp., tanto en el suelo como en la planta (Mercado-Blanco *et al.*, 2001; Mercado-Blanco *et al.*, 2002; Paplomatas, 2004; Fradín y Thomma, 2006). Tales técnicas se refieren al uso de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), Restricción de Fragmentos de Longitud Polimórfica (RFLP), Amplificación Aleatoria de Fragmentos de ADN Polimórfico (RAPD) y la Secuenciación de Espacios Intergénicos (IGS) (Griffen *et al.*, 1997; Radisek *et al.*, 2006). Nazar *et al.* (1991) y Robb *et al.* (1993) describieron la metodología PCR utilizando partidores universales que amplifican las regiones internas ITS1 e ITS2 del gen del ADN ribosomal para distinguir entre *V. albo-atrum*, *V. dahliae* y *V. tricorpus*. Avances en la determinación nucleotídica de la región ITS del ADN han proporcionado un diagnóstico confiable y preciso de *Verticillium* spp. (Moukhamedov *et al.*, 1994).

La detección de patógenos de plantas mediante la técnica de PCR tiene importantes ventajas en comparación al método tradicional (Henson y French, 1993), debido a la rapidez (1 a 2 días), sensibilidad, reproductibilidad y confiabilidad que presenta por sobre la recuperación *in vitro* (Robb *et al.*, 1994; Mahuku *et al.*, 1999; Platt y Mahuku, 2000). El método de cultivo en medio artificial es de menor sensibilidad ya que requiere de un largo período de incubación (1 a 2 semanas), pudiendo obtener así una alta proporción de resultados negativos. A esto se suma el problema de la presencia de patógenos contaminantes, debido al largo período de incubación de las muestras, lo cual puede guiar a un erróneo diagnóstico del patógeno (Dhingra y Sinclair, 1985; Plasencia y Bantari, 1997; Platt y Mahuku, 2000).

De esta forma, tanto la técnica de PCR directo como nested PCR (PCR anidado) pueden ser utilizados para la detección del patógeno mediante la propagación de material vegetal infectado (Karajeh y Masoud, 2006).

Hipótesis

Verticillium albo-atrum es el agente causal de los síntomas de marchitez y decaimiento en plantas de kiwi dorado cultivar Hort16A.

Objetivos

1. Mediante los postulados de Koch, comprobar la patogenicidad de *V. albo-atrum* en plantas de kiwi dorado Hort16A.
2. Detectar molecularmente la presencia de *V. albo-atrum* en plantas de kiwi dorado Hort16A con síntomas de marchitez y decaimiento.

MATERIALES Y MÉTODO

Lugar de investigación

El ensayo de campo y posterior análisis de las plantas inoculadas se efectuó en el Campus Antumapu y en el Laboratorio de Fitopatología Frutal y Molecular del Departamento de Sanidad Vegetal de la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de Chile.

Materiales y reactivos

Medios de cultivos

- Agar agua con antibiótico (AA): Siembra de muestras de plantas.
- Agar Papa Dextrosa (APD): Inoculación, repique, mantención de cultivo puro del patógeno y crecimiento miceliar.
- Caldo glucosado (CG): Siembra de micelio puro del patógeno y obtención de biomasa utilizada en extracción de ADN.
- “Talboys” (PLYA): Caracterización morfológica de los aislados de *V. albo-atrum* y *V. dahliae* (Talboys, 1960).

Inoculación artificial de plantas

Cultivos: Cultivo puro de *V. albo-atrum*.

Plantas: Plantas de kiwi dorado cultivar Hort16A injertadas sobre patrón Hayward de un año de edad.

Identificación y caracterización morfológica

Cultivos: Cultivos puros de *V. albo-atrum* y *V. dahliae*.

Equipos utilizados: Cámara de flujo laminar vertical (Factomet_{MR}) modelo VR 24242, cámara de crecimiento Precisión Scientific modelo 805 incubator, microscopio Nikon labophot.

Aislamiento y cultivo del material fúngico

Reactivos y materiales: Alcohol técnico 95%, cloro 2%, agua destilada estéril, papel

absorbente, placas de Petri (90 mm).

Equipos utilizados: Cámara de flujo laminar vertical (Factomet_{MR}) modelo VR 24242, cámara de crecimiento Precisión Scientific modelo 805 Incubator, Micro centrifuga modelo Micro Spin 12S de Sorvall Instruments.

Extracción de ADN

Reactivos y materiales: Acetato de amonio 7,5 M, agua destilada estéril, buffer fosfato, buffer SDS, cloroformo alcohol isoamílico (24:1), etanol 70%, isopropanol, buffer CTAB, cloroformo octanol (24:1), RNasa.

Equipos para la extracción del ADN: Cámara de mantención baño húmedo Memert, Micro centrifuga modelo Micro Spin 12S de Sorvall Instruments, agitador Thermolyne Maxi Mix type 37600 Mixer, Refrigerador Samsung modelo Cool Tech, Thermo scientific Revco - 80°C, liofilizador L101 Liotop.

Amplificación de ADN

Reactivos y materiales para PCR: Buffer PCR 10x, MgCl₂ 50 mM, dNTPs 100 mM, Taq DNA polimerasa 5U, partidores 100 mM, agua destilada estéril, ADN *V. albo-atrum*, ADN *Botrytis cinerea*.

Equipos para PCR: Micro centrifuga modelo Micro Spin 12S Sorvall Instruments, agitador Thermolyne Maxi Mix type 37600 Mixer, Refrigerador Samsung Cool Tech, termociclador Esco.

Reactivos y materiales para electroforesis: Agarosa, buffer TBE 1x, Gel red 10000x Biotium, marcador de peso molecular 100 pb, buffer de carga 6x.

Equipos para electroforesis: Cámara de electroforesis (Pharmacia Biotech Inc), cámara fotográfica digital Canon power shot, Ultra cam digital Imaging (ultra lum), transiluminador de luz UV (Vilbert Lourmat), fuente de poder Biorad Power-Pac 300.

Método

Aislamiento y caracterización morfológica

Aislamiento del agente fungoso asociado a plantas enfermas

Desde plantas de kiwi dorado cultivar Hort16A con síntomas típicos de clorosis, marchitez de hojas y muerte de brazos se colectaron trozos de madera, los cuales fueron desinfectados y dispuestos en medio de cultivo APD e incubados a 25°C y oscuridad continua entre una y dos semanas hasta la expresión del patógeno (Auger *et al.*, 2009a; Auger *et al.*, 2009b).

Identificación del agente causal

La identificación del patógeno se realizó en base a las características morfológicas (macro y microscópicas) de las colonias de los aislados recuperados desde las plantas enfermas, tales como: color de colonia, presencia o ausencia de hifas melanizadas, microesclerocios o clamidosporas, filalides, conidias y conidióforos. Los aislados recuperados fueron identificados y mantenidos en medio de cultivo APD (Talboys, 1960; Isaac, 1967; Barnett y Hunter, 1998; EPPO, 2007; Qin *et al.*, 2008; Auger *et al.*, 2009a; Auger *et al.*, 2009b).

Prueba de patogenicidad

Inoculación artificial

Para comprobar la patogenicidad del aislado, se realizó una inoculación en raíces de plantas de kiwi dorado cultivar Hort16A de un año de edad (tratamiento 1) injertadas sobre patrón del cultivar Hayward, para lo cual se efectuaron cortes en el extremo de las raíces y posteriormente se sumergieron por 30 minutos en una suspensión conidial de 10^6 conidias·mL⁻¹ de *V. albo-atrum* (Mercado-Blanco *et al.*, 2002; Pegg y Brady, 2002). Las plantas testigos (tratamiento 2), en cambio fueron sumergidas por igual tiempo en agua destilada estéril.

Aislamiento y cultivo del material fúngico

Desde plantas de kiwi dorado cultivar Hort16A inoculadas con *V. albo-atrum* y con agua destilada estéril, se colectaron trozos de madera provenientes de la raíz y del tallo, los cuales fueron desinfectados y dispuestos en placas de Petri conteniendo medio de cultivo AA, e incubados a 25°C y oscuridad continua entre una y dos semanas. Posteriormente en medio APD se realizó el incremento del hongo.

Identificación molecular

Obtención de biomasa fungosa

Se realizó a partir de cultivos puros de *V. albo-atrum* recuperados desde las plantas inoculadas con el patógeno, de 7 días de edad dispuestos en caldo glucosado e incubados a 20°C y luz continua. Una vez obtenida una adecuada masa fúngica, se procedió a centrifugar por 10 minutos a 3200 r.p.m y a congelar para su posterior liofilización durante 24 horas.

Extracción de ADN desde micelio

La extracción de ADN de las muestras liofilizadas se realizó de acuerdo al protocolo modificado de Volossiuk *et al.* (1995):

1. Se procedió a la molienda en un mortero de porcelana frío.
2. Se adicionó 300 µL de buffer fosfato y 300 µL de buffer de extracción SDS y se invirtió. Posteriormente se adicionó 300 µL de cloroformo alcohol isoamílico (24:1) y se agitó en un vortex.
3. Se transfirió el sobrenadante a un tubo Eppendorf de 1,5 mL.
4. Se adicionó acetato de amonio (7,5 M), invirtió y centrifugó, transfiriéndose el sobrenadante a un tubo Eppendorf de 1,5 mL.
5. Se adicionó 600 µL de isopropanol frío, invirtió e incubó a temperatura ambiente.
6. Se descartó el sobrenadante, se agregó 1 mL de etanol (-20°C) y se descartó el sobrenadante. Se secó el pellet y se resuspendió en 120 µL de agua destilada estéril.

Obtención y extracción de ADN desde tejido vegetal

El ADN genómico fue obtenido desde el tejido vegetal de raíces y tallos de plantas de kiwi dorado cultivar Hort16A inoculadas con *V. albo-atrum*. Igual procedimiento se realizó para las plantas testigo inoculadas con agua destilada estéril. A partir de 50 mg de tejido vegetal y posterior liofilización durante 30 horas, se realizó la extracción del ADN de las muestras en base a solución de extracción CTAB, de acuerdo a la metodología, con modificaciones, descrita por Pérez-Artés *et al.* (2000); Masoud (2002); CIMMYT (2005) y Karajeh y Masoud (2006):

1. Se procedió a la molienda del tejido liofilizado y posterior adición de 1 mL de buffer CTAB.
2. Se incubó por 60 minutos.
3. Se adicionó 1 mL de cloroformo: octanol (24:1) por 10 minutos.

4. Se centrifugó por 10 minutos.
5. Se removió el sobrenadante a un nuevo tubo.
6. Se adicionó 10 µl de RNasa y se incubó por 30 minutos.
7. Se adicionó y mezcló con 1 mL de isopropanol.
8. Se removió el sobrenadante y se secó el ADN a temperatura ambiente.
9. Se re-suspendió en 200 µl de buffer TE.

Amplificación de ADN

En la amplificación del espacio intergénico entre los genes 18S y 28S que codifican para RNA ribosomal del micelio del hongo, se utilizó la técnica de PCR a través de una única reacción, utilizando los partidores específicos FVAL6/RVA basados en la región ITS1 e ITS2 de *V. albo-atrum* (Zheng-Guang *et al.*, 2005; Schall, 2008) que amplifican un producto de PCR de aproximadamente 330 pb (Cuadro 1). Un aislado de *V. albo-atrum* previamente caracterizado y secuenciado se utilizó como control positivo (Auger *et al.*, 2009a; Auger *et al.*, 2009b) y un aislado de *Botrytis cinerea* Pers. fue utilizado como control negativo.

Cuadro 1. Partidores para PCR y PCR anidado.

Partidores	Secuencia (5' - 3')	Autor
FVAL6	(5'-CGGTACATCAGTCTCTTTATTC-3')	Schall (2008)
RVA	(5'-TCCGATGCGAGCTGTAAT-3')	Schall (2008)
NESF18S	(5'-CTCATAACCCTTTGTGAACC-3')	Karajeh y Masoud (2006)
NESR28S	(5'-CCGAGGTCAACCGTTGCCG-3')	Karajeh y Masoud (2006)

De acuerdo al programa utilizado en el termociclador, los ciclos de amplificación del ADN obtenido desde el micelio de *V. albo-atrum* consistieron en una única reacción de desnaturalización a 94°C por 5 minutos, seguido de una reacción de alineación de 35 ciclos de 30 segundos cada una a 94, 66 y 72°C respectivamente, y una última reacción de extensión a 72°C por 7 minutos (CIMMYT, 2005; Schall, 2008). Posteriormente el ADN amplificado fue visualizado mediante una electroforesis en gel de agarosa 1,5% a 92 volts y 400 mA.

La amplificación del ADN genómico obtenido directamente desde tejido vegetal, se realizó mediante la técnica de PCR anidado, utilizando en la primera reacción los partidores de *Verticillium* spp. NESF18S y NESR28S que amplifican un producto de PCR de

aproximadamente 450 pb (Karajeh y Masoud, 2006) (Cuadro 1) y en la segunda reacción de PCR los partidores específicos FVAL6/RVA para *V. albo-atrum* (Schall, 2008). ADN purificado desde el micelio de *V. albo-atrum* fue utilizado como control positivo y ADN recuperado desde el tejido vegetal de las plantas inoculadas con agua destilada estéril, se utilizó como control negativo.

Los ciclos de amplificación en la primera reacción utilizando los partidores NESF18S y NESR28S consistieron en una fase de desnaturalización a 94°C por 4 minutos, una fase de alineación de 35 ciclos de 1 minuto a 94, 56 y 72°C respectivamente y una última etapa de extensión a 72°C por 6 minutos. En la segunda reacción de amplificación con los partidores específicos, los respectivos ciclos se señalan a continuación: 1 ciclo de 94°C por 4 minutos, seguido de 30 ciclos de 1 minuto a 94, 61 y 72°C respectivamente, un ciclo de 1 minuto a 94, 58 y 72°C y un último ciclo de extensión a 72°C por 6 minutos (Pérez-Artés *et al.*, 2000; CIMMYT, 2005; Karajeh y Masoud, 2006). Posteriormente el ADN amplificado fue visualizado mediante una electroforesis en gel de agarosa 1% a 92 volts y 400 mA.

Comparación entre *V. albo-atrum* y *V. dahliae*

Posteriormente el aislado recuperado, fue comparado morfológicamente con un aislado de *V. dahliae* de acuerdo a las características ya descritas. Para realizar la correspondiente evaluación y diferenciación de la morfología de cada especie, se midió el largo y ancho de 50 conidias y fialides respectivamente (EPPO, 2007; Qin *et al.*, 2008). El crecimiento de cada especie se realizó en el medio de cultivo “Talboys” a 25°C y oscuridad continua (Talboys, 1960).

Además, se evaluó el comportamiento y respuesta de *V. albo-atrum* y *V. dahliae* a las siguientes temperaturas: 5, 10, 15, 20, 25 y 30°C (Jabnoun-Khiareddine *et al.*, 2006a; Qin *et al.*, 2008). A partir de cultivos con dos semanas de crecimiento a 25°C y oscuridad continua, se realizó un repique, el que fue posteriormente dispuesto en placas de Petri con medio de cultivo APD. El diámetro de cada colonia fue medido cada dos días durante dieciocho días y diez placas de cada especie fueron incubadas por cada temperatura (Qin *et al.*, 2008).

Diseño Experimental y Análisis Estadístico

El diseño experimental correspondió a un diseño completamente al azar compuesto de dos tratamientos (T1= plantas inoculadas y T2= plantas testigo). Se consideraron 20 repeticiones por cada tratamiento, siendo cada planta la unidad experimental.

Las plantas se evaluaron mediante un índice de severidad basado en el porcentaje de marchitez foliar por planta, en donde: 0= sin síntomas, 1= marchitez <25%, 2= marchitez ≥25%, 3= marchitez ≥50%, 4=marchitez ≥90% y 5= muerte de plantas (Happstadius *et al.*, 2003). El índice de severidad para cada tratamiento fue evaluado según la fórmula:

$$\text{Índice Severidad: } \frac{(0 \times N_0) + (1 \times N_1) + (2 \times N_2) + (3 \times N_3) + (4 \times N_4) + (5 \times N_5)}{N_0 + N_1 + N_2 + N_3 + N_4 + N_5}$$

Dónde, N_n : número de plantas de cada categoría.

Los resultados obtenidos a través de las evaluaciones realizadas para determinar el índice de severidad fueron analizados mediante un análisis de varianza. Además se analizó el comportamiento de *V. albo-atrum* y *V. dahliae* a diferentes temperaturas (5 a 30°C), considerando 10 repeticiones por temperatura y especie. Los resultados fueron analizados con el software Minitab release v.13 a través de un análisis de varianza y sometidos a la prueba de comparación múltiple de SNK.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aislamiento e identificación

El aislado recuperado desde las plantas de kiwi dorado cultivar Hort16A e identificado por medio de las características morfológicas y de cultivo, correspondió a *Verticillium albo-atrum* (Talboys, 1960; Isaac, 1967; Pegg y Brady, 2002; EPPO, 2007; Auger *et al.*, 2009a; Auger *et al.*, 2009b). Presentó hifas melanizadas y ausencia de microesclerocios y presencia de colonias de color que variaron de blanco a gris. Las conidias fueron de forma irregular con un tamaño promedio de $4,4 \times 2,44 \mu\text{m}$, conidióforos verticilados con 3 a 4 fialides de tamaño promedio de $30,10 \times 2,26 \mu\text{m}$ y una longitud promedio de $60 \mu\text{m}$ aproximadamente por conidióforo (Figura 1).

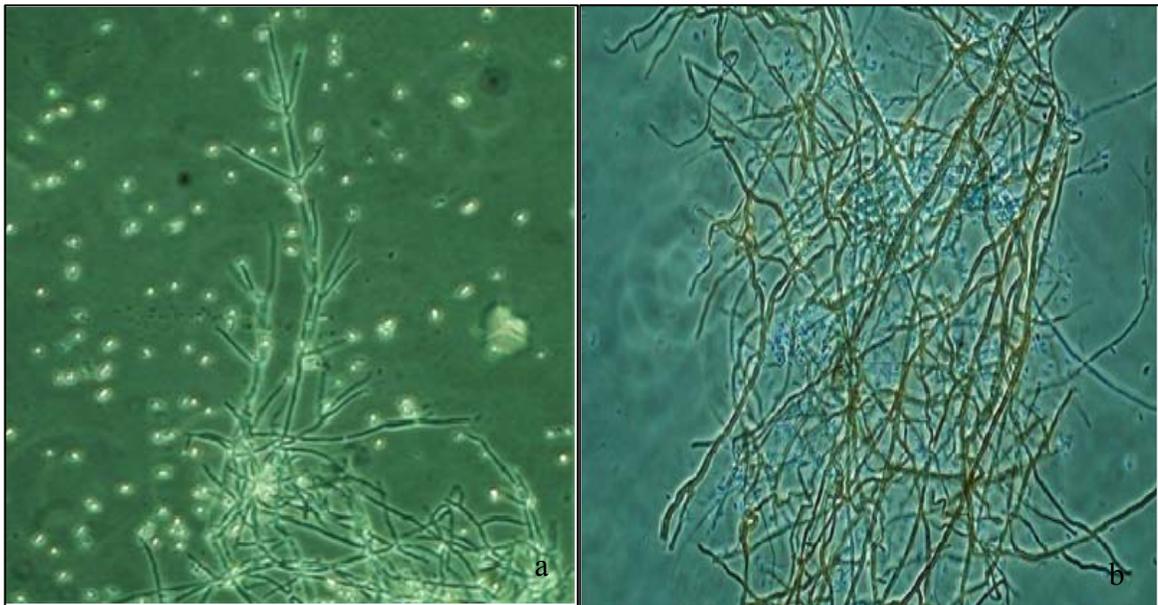


Figura 1. a) Conidióforos, y b) Hifas melanizadas de *V. albo-atrum*.

Prueba de patogenicidad

Las plantas inoculadas con *V. albo-atrum* manifestaron clorosis, marchitez, necrosis foliar y/o muerte, similares a los síntomas observados en plantas afectadas por *Verticillium* spp. (Fradin y Thommas, 2006; EPPO, 2007).

La sintomatología ocasionada por *V. albo-atrum* se evaluó a los 60 días post-inoculación mediante un índice de severidad en una escala arbitraria de 0 a 5, según los síntomas de marchitez y/o muerte de plantas (Happstadius *et al.*, 2003; Jabnoun-Khiareddine *et al.*, 2006a). El valor promedio del índice de severidad para las 20 plantas en el tratamiento 1 (plantas inoculadas) fue igual a 3,2; lo cual indica un valor mayor al 50% de marchitez por

planta, en cambio en las plantas testigo el valor promedio del índice de severidad fue de 0,5, lo que equivale a una marchitez menor al 25% o ausencia de síntomas, lo cual puede observarse en la Figura 2b.



Figura 2. a) Plantas inoculadas con *V. albo atrum*; b) plantas sumergidas en agua destilada estéril.

Al analizar los promedios de los índices de severidad por tratamiento y al realizar un análisis de varianza entre ambos tratamientos, se observaron diferencias significativas ($p < 0,05$), comprobándose de esta forma, un efecto directo de *V. albo-atrum* sobre la sintomatología de las plantas de kiwi dorado cultivar Hort16A.

Recuperación e identificación del patógeno

Al recuperar el patógeno en medio de cultivo AA, se comprobó la presencia de *V. albo-atrum* en las plantas inoculadas y sintomáticas, recuperándose en 16 de las 20 plantas inoculadas. Las restantes 4 plantas correspondieron a plantas muertas. En las plantas inoculadas con agua destilada estéril no se recuperó a *V. albo-atrum*. Los aislados recuperados desde las plantas de kiwi dorado cultivar Hort16A presentaron idénticas características morfológicas (macro y microscópicas) que el aislado de *V. albo-atrum* previamente inoculado (Talboys, 1960; Isaac, 1967; Pegg y Brady, 2002; EPPO, 2007; Auger *et al.*, 2009a; Auger *et al.*, 2009b).

Identificación molecular

A partir del ADN obtenido desde el micelio de *V. albo-atrum*, recuperado desde las plantas inoculadas con el patógeno y mediante una única reacción de PCR utilizando los partidores específicos FVAL6/RVA, se amplificó un fragmento de aproximadamente 330 pares de bases (pb) en las muestras analizadas. Un fragmento de igual tamaño se obtuvo al amplificar el ADN del micelio del control positivo de *V. albo-atrum*. A través de la misma reacción de PCR del ADN extraído del micelio de *Botrytis cinerea* no se obtuvo amplificación (Figura 3).

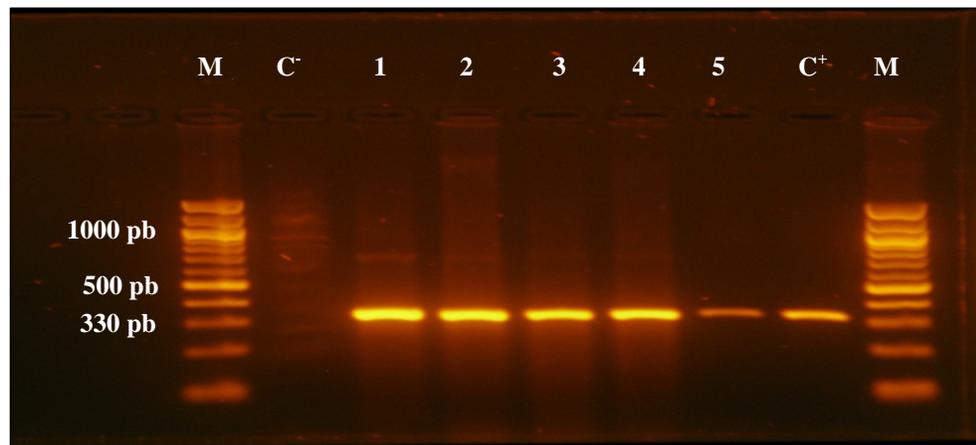


Figura 3. Fragmento amplificado del ADN miceliar de *V. albo-atrum* utilizando los partidores específicos de la región ITS del ADN ribosomal del hongo (M= marcador; C⁻= control negativo *Botrytis cinerea*; C⁺= control positivo *V. albo-atrum* de aproximadamente 330 pb; muestras 1 a 5: ADN amplificado del micelio de *V. albo-atrum*).

La amplificación del ADN genómico obtenido desde el tejido vegetal de las plantas de kiwi dorado cultivar Hort16A inoculadas con *V. albo-atrum*, se realizó a través de una doble reacción de PCR anidado. En la primera reacción, utilizando los partidores para *Verticillium* spp. NESF18S y NESR28S, se obtuvo un producto de PCR de aproximadamente 450 pb y en la segunda reacción de PCR mediante los partidores específicos FVAL6/RVA para *V. albo-atrum*, se amplificó un fragmento de aproximadamente 330 pb. En las plantas sumergidas en agua destilada estéril correspondientes al control negativo, no se recuperó a *V. albo-atrum*, por lo tanto no se obtuvo amplificación alguna (Figura 4).

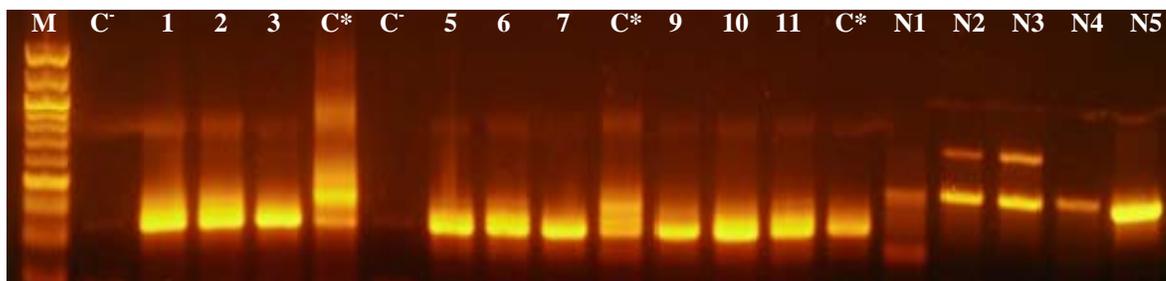


Figura 4. Fragmento amplificado del ADN genómico de *V. albo-atrum* obtenido directamente desde tejido vegetal: (M: marcador de peso molecular; C: ADN recuperado desde plantas inoculadas con agua destilada estéril; C*: ADN purificado desde micelio de *V. albo-atrum*; muestras 1-3, 5-7, 9-11: productos de la segunda amplificación de ADN extraído desde plantas inoculadas con *V. albo-atrum* con los partidores FVAL6/RVA; N1 a N5: producto de la primera amplificación de ADN con los partidores NESF18S/NESR28S.

De acuerdo al rango de hospederos, *V. albo-atrum* se clasifica en dos grupos: grupo de aislados que afectan la alfalfa (grupo lucerne: L) y aislados que no afectan la alfalfa (grupo no lucerne: NL) (Radisek *et al.*, 2003). En base a la amplificación y secuenciación de la zona de transcripción interna del espacio intergénico entre los genes 18S y 28S que codifican para el RNA ribosomal mediante los partidores ITS1 e ITS4, existe un alto grado de homología (98% de identidad) en las secuencias de las bases nucleotídicas de un fragmento de ADN entre el aislado recuperado desde las plantas de kiwi dorado cultivar Hort16A y el aislado de *V. albo-atrum* asociado al grupo Lucerne: L (NCBI acceso N°108476) (Auger *et al.*, 2009a; Auger *et al.*, 2009b).

Zheng-Guang *et al.* (2005) al utilizar los partidores específicos VAA1 y VAA2 de la región ITS lograron amplificar una banda simple de 330 pb para detectar a *V. albo-atrum* en plantas enfermas y en suelo contaminado con el patógeno. Por su parte Kareem Al-Taae y Hazim Al-Taae (2010) utilizando el partidore FVA correspondiente a la región ITS1 de *V. albo-atrum* amplifican una zona de 337 pb. Carder y Barbara (1999) en aislados de *V. albo-atrum* recuperados desde lúpulo utilizando diferentes partidores de la región ITS, obtuvieron la amplificación de fragmentos variables entre los 230 y 350 pares de bases, mientras que Collin *et al.* (2003) utilizando partidores de la región ITS1 e ITS2, amplificaron sólo un segmento de 452 pb en aislados de alfalfa y lúpulo respectivamente. En olivo, al utilizar los partidores NESF y NESR para *Verticillium* spp. Karajeh y Masoud (2006) y Kareem Al-Taae y Hazim Al-Taae (2010) obtuvieron un producto PCR de 480 pb.

De acuerdo a los resultados obtenidos a través de la amplificación del ADN genómico del micelio del hongo y del ADN genómico extraído directamente desde tejido vegetal y de la caracterización morfológica, se confirmó la identidad de *V. albo-atrum* recuperado desde las plantas inoculadas de kiwi dorado cultivar Hort16A.

Comparación entre *V. albo-atrum* y *V. dahliae*

Diferencias morfológicas

La caracterización y diferenciación de *V. albo-atrum* de *V. dahliae* se realizó en base a las características morfológicas y de cultivo descritas para ambas especies, permitiendo así distinguir mediante observaciones (micro y macroscópicas) una especie de otra (Talboys, 1960; Isaac, 1967; Jabnoun-Khiareddine *et al.*, 2006a; Jabnoun-Khiareddine *et al.*, 2006b). Las principales diferencias morfológicas entre ambas especies se presentan en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Características morfológicas de *V. albo-atrum* y *V. dahliae*.

Característica	Especie	
	<i>Verticillium albo-atrum</i>	<i>Verticillium dahliae</i>
Color de colonia	blanca a gris	blanca a negra
Estructura dormante	hifas melanizadas	microesclerocios
Tamaño conidia (µm)	1,5-9,0 × 1,0-4,5	1,5-7,5 × 1,0-3,0
Tamaño fialide (µm)	15-62,5 × 1,0-2,5	12,5-55 × 0,5-2,5
Número de fialides	3 a 4	3 a 5

La principal diferencia morfológica que permite distinguir entre una especie y otra, es la estructura dormante que presentan, siendo para *V. albo-atrum* la presencia de hifas melanizadas y de microesclerocios en el caso de *V. dahliae*. A través del crecimiento en el medio de cultivo “Talboys” (Talboys, 1960), se diferenciaron macroscópicamente ambas especies mediante el color y forma de la colonia. Como se observa en la Figura 5, la colonia de *V. albo-atrum* al iniciar su crecimiento es de color blanco y a medida que envejece cambia a color gris, en cambio la de *V. dahliae* cambia a negro.

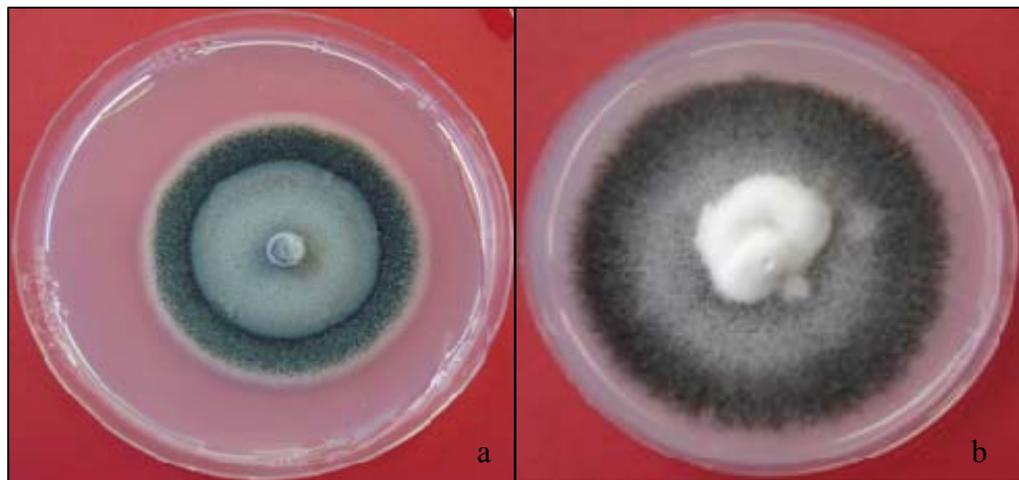


Figura 5. a) *V. albo-atrum*; b) *V. dahliae*

Tamaño de conidias

De acuerdo a los resultados obtenidos en la medición del largo y ancho promedio de conidias de ambas especies, *V. albo-atrum* presentó un tamaño de conidias (largo por ancho) que varió entre 1,5 a 9,0 por 1,0 a 4,5 μm , con un promedio de $4,4 \times 2,44 \mu\text{m}$. El tamaño conidial de *V. dahliae* fue de 1,5 a 7,5 por 1,0 a 3,0 μm con un promedio de $4,2 \times 1,8 \mu\text{m}$ (Figura 6). Los resultados obtenidos en este estudio son similares a los publicados por Kim *et al.* (2001) y EPPO (2007) ($3,5-12,5 \times 2-4$ en *V. albo-atrum* y $2,5-8 \times 1,4-3,2$ en *V. dahliae*), utilizando aislados de *V. albo-atrum* recuperados desde lúpulo y tomate, y a los descritos por Pegg y Brady (2002) para *V. albo-atrum* y *V. dahliae* (medidas entre $3,5-7 \times 1,8-2,6$ a $5-13 \times 1,8-2,5$ y $3-5 \times 1,3-2$ a $4-6 \times 1,8-2$ respectivamente).

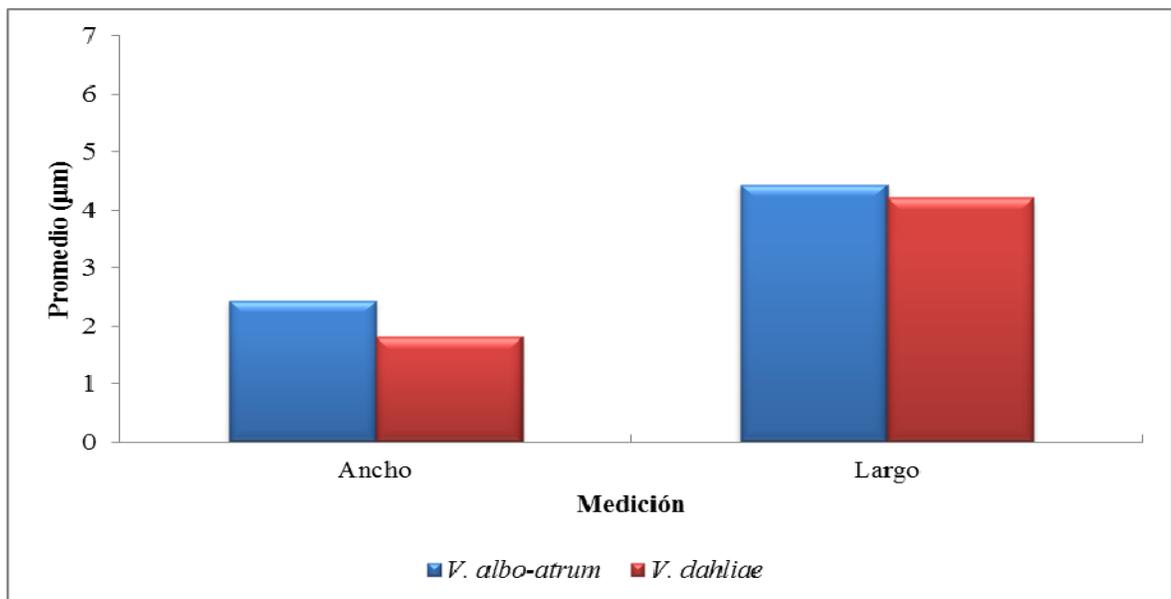


Figura 6. Largo y ancho promedio de conidias de *V. albo-atrum* y *V. dahliae*.

Tamaño de fialides

El tamaño de las fialides de *V. albo-atrum* varió entre 15 a 62,5 por 1,0 a 2,5 μm con un promedio de $30,10 \times 2,26 \mu\text{m}$. En cambio las fialides de *V. dahliae* presentaron medidas fluctuantes entre 12,5 a 55 por 0,5 a 2,5 μm y un promedio de $28,0 \times 2,18 \mu\text{m}$ (Figura 7). De acuerdo a los resultados de los estudios publicados por Kim *et al.* (2001) y EPPO (2007) con aislados de *Verticillium* spp. recuperados desde tomate y lúpulo, se pudieron observar similares rangos de medidas ($14-26 \times 1-2,5$ y $20-50 \times 1,4-3,2$ en *V. albo-atrum* y de $16-35 \times 1-2,5$ en *V. dahliae*) con los observados en el presente estudio.

Otras características que presentaron ambas especies, correspondieron al número de fialides por conidióforo. *V. albo-atrum* presentó generalmente entre 3 a 4 fialides, en cambio *V. dahliae* entre 3 y 5 fialides.

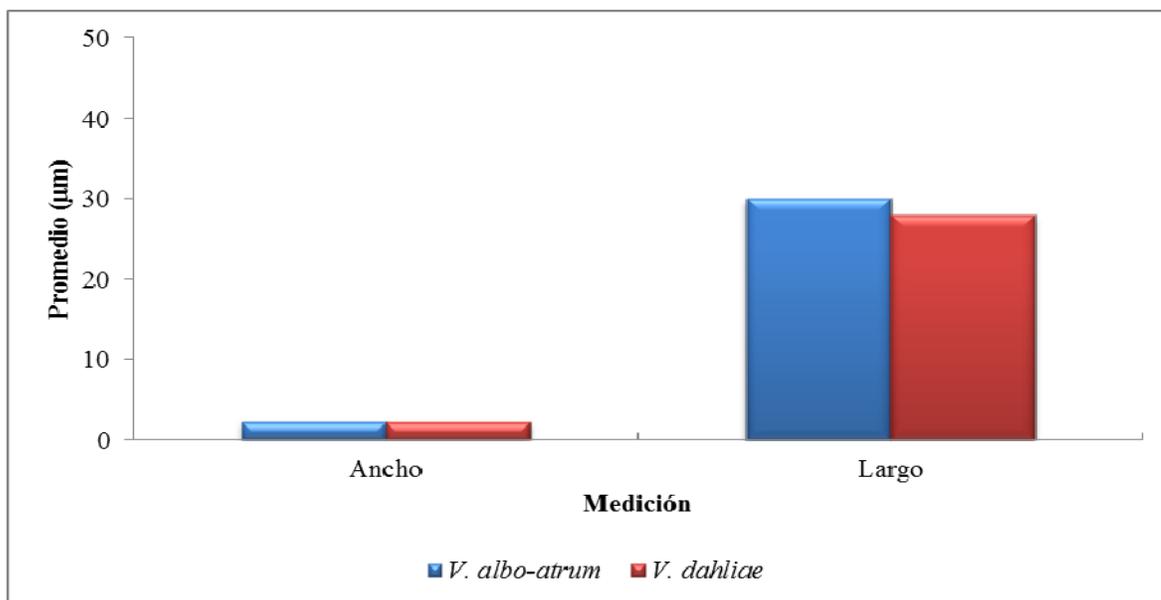


Figura 7. Largo y ancho promedio de fialides de *V. albo-atrum* y de *V. dahliae*.

Efecto de la temperatura

Las evaluaciones del crecimiento de *V. albo-atrum* y de *V. dahliae* entre 5, 10, 15, 20, 25 y 30°C, permitieron determinar las temperaturas críticas y óptimas de crecimiento para cada especie.

De acuerdo a los resultados obtenidos en las mediciones durante 18 días se pudo concluir que para *V. albo-atrum* el menor crecimiento de la colonia se registró a 5 y 30°C (18,1 y 3,9 mm, respectivamente), no así a temperaturas entre 10 y 25°C, donde se produjo la mayor tasa de crecimiento, concluyendo que la temperatura óptima de crecimiento de *V. albo-atrum* fue a 20°C (49,6 mm a los 18 días) (Figura 8). Los resultados evidenciaron notorias diferencias en el diámetro final de cada colonia al ser expuesta a las diferentes temperaturas.

Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Jabnoun-Khiareddine *et al.* (2006a) y Jabnoun-Khiareddine *et al.* (2006b) con aislados de tomate y berenjena, en donde la temperatura ideal para el crecimiento del patógeno fue a 20°C. En cambio, Basu y Butler (1991) y Qin *et al.* (2008) trabajando con aislados de *V. albo-atrum* recuperados desde alfalfa, encontraron que el mayor crecimiento de *V. albo-atrum* ocurrió a 25°C. Jabnoun-Khiareddine *et al.* (2006a) y Jabnoun-Khiareddine *et al.* (2006b) obtuvieron que el menor crecimiento de *V. albo-atrum* se producía a 5°C, el cual difiere con los resultados obtenidos en este trabajo, en donde el menor crecimiento se registró a 30°C.

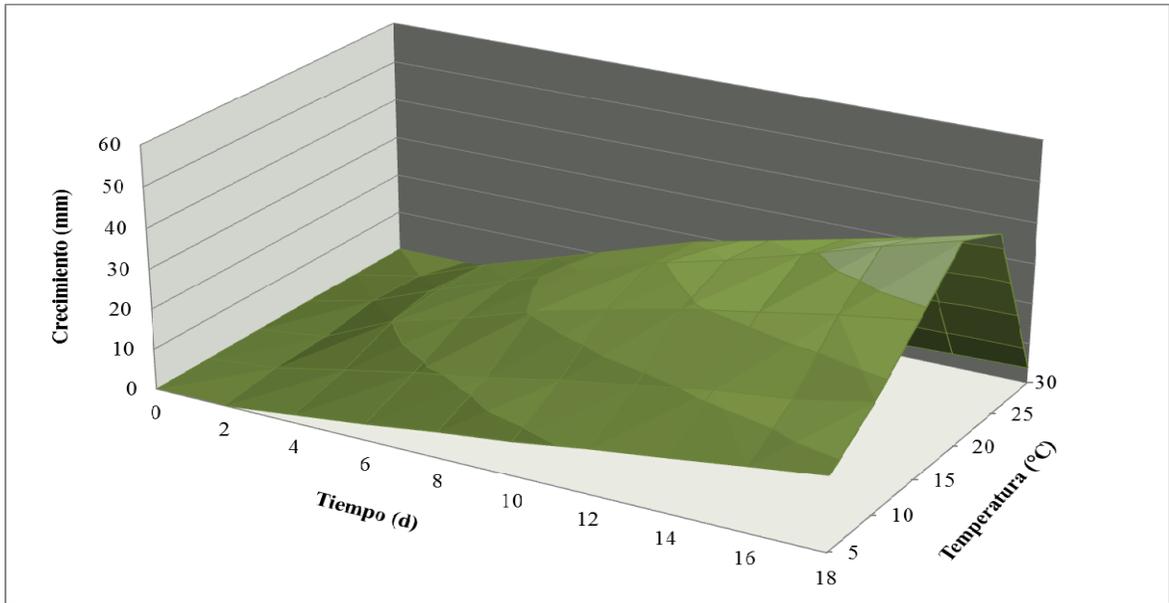


Figura 8. Crecimiento promedio de *V. albo-atrum* a temperaturas entre 5 y 30°C durante 18 días.

En *V. dahliae*, al igual que en *V. albo-atrum*, el menor crecimiento se presentó a 5 y 30°C (12,2 y 16,3 mm respectivamente), moderado crecimiento a 10°C y un incremento en el diámetro de la colonia a partir de los 15°C, observándose que el mayor crecimiento se presentó entre los 20 y 25°C. Sin embargo, a diferencia de *V. albo-atrum* el mayor crecimiento de *V. dahliae* se obtuvo a 25°C (54 mm al día 18) (Figura 9).

En estudios efectuados con aislados de *V. dahliae* de alcachofa (*Cynara scolymus* L.) y de lechuga (*Lactuca sativa* L.), se determinó que a 25°C se producía el mayor crecimiento de la colonia (Qin *et al.*, 2008). Estudios realizados por (Jabnoun-Khiareddine *et al.*, 2006a; Jabnoun-Khiareddine *et al.*, 2006b) en cultivos de papa, tomate y berenjena sostienen que el menor y mayor crecimiento se obtiene a 0 y 20° respectivamente. Estos resultados indicarían variaciones en la temperatura óptima de crecimiento tanto de *V. albo-atrum* como de *V. dahliae* según el hospedero afectado.

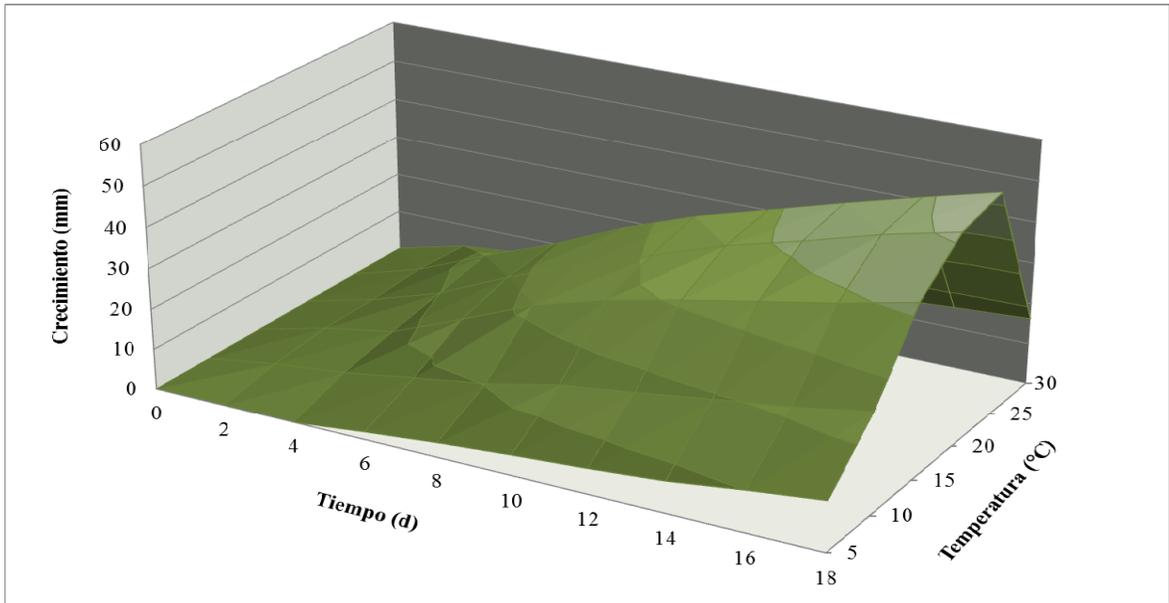


Figura 9. Crecimiento promedio de *V. dahliae* a temperaturas entre 5 y 30°C durante 18 días.

En la Figura 10 se puede observar que al cabo de 18 días *V. albo-atrum* presenta el menor crecimiento a 30°C (3,9 mm) y *V. dahliae* a 5°C (12,2 mm). *V. albo-atrum* presentó el mayor crecimiento a 20°C (49,6 mm), en cambio *V. dahliae* a 25°C (54,0 mm) alcanza su temperatura óptima. Kim *et al.* (2001), Jabnoun-Khiareddine *et al.* (2006a) y Jabnoun-Khiareddine *et al.* (2006b), detallan que la temperatura ideal de ambas especies se encuentra entre los 20 y 25°C respectivamente, y que a temperaturas extremas existe una disminución en la actividad de ambos patógenos, lo cual se observa en el presente trabajo.

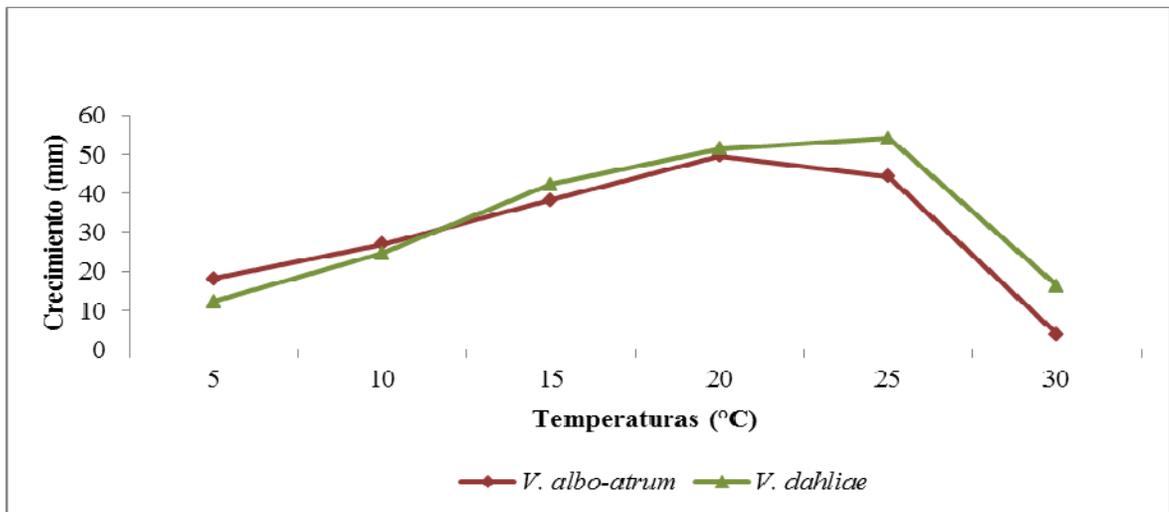


Figura 10. Crecimiento promedio de *V. albo-atrum* y *V. dahliae* a temperaturas entre 5 y 30°C durante 18 días.

CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos en el presente estudio:

- Se comprobó la patogenicidad de *V. albo-atrum*, recuperando el hongo inoculado desde las plantas de kiwi dorado cultivar Hort16A con síntomas de marchitez y decaimiento.
- Se identificó a *V. albo-atrum* mediante caracterización morfológica y a través de la amplificación del espacio intergénico entre los genes 18S y 28S que codifican para el RNA ribosomal del micelio del hongo.
- Mediante la técnica de PCR anidado se detectó la presencia de *V. albo-atrum* en tejido vegetal de tallo y raíces de kiwi dorado cultivar Hort16A con síntomas de marchitez y decaimiento.
- De acuerdo a sus características morfológicas y a la temperatura óptima de crecimiento, fue posible distinguir a *V. albo-atrum* de *V. dahliae*.

BIBLIOGRAFÍA

Auger, J., I. Pérez., M. Rubilar., R.A. Fullerton and M. Esterio. 2009a. Marchitez violenta y muerte de plantas de kiwi dorado (*Actinidia chinensis* Planch) cv. Hort16A en Chile. *Fitopatología* 44 (1): 18.

Auger, J., I. Pérez., R.A. Fullerton and M. Esterio. 2009b. First report of *Verticillium* wilt of gold kiwifruit *Actinidia chinensis* cv. Hort16A caused by *Verticillium albo-atrum* in Chile. *Plant Disease* 93 (5): 553.

Back, M.A., P.P.J. Haydock and P. Jenkinson. 2002. Disease complexes involving plant parasitic nematodes and soilborne pathogens. *Plant Pathology* 51: 683-697.

Barbara, D.J and E. Clewes. 2003. Plant pathogenic *Verticillium* species: how many of them are there?. *Molecular Plant Pathology* 4 (4): 297-305.

Barnett, H.L and B. Hunter. 1998. Illustrated genera of imperfect fungi. 4th ed. APS Press. 218p.

Basu, P.K and G. Butlet. 1991. Colony growth response to temperature and pathogenicity of isolates of *Verticillium albo-atrum* from alfalfa in Canada. *Canadian Journal of Plant Pathology* 13: 112-115.

Berbegal, M., J. García-Jimenez and J. Armengol. 2008. Effect of cauliflower residue amendments and soil solarization on *Verticillium* wilt control in artichoke. *Plant Disease* 92: 595-600.

Carder, J.H and D.J. Barbara. 1999. Taxonomic status of putative *Verticillium albo-atrum* isolates. *FEMS Microbiology Letters* 170: 211-219.

CIMMYT. 2005. Laboratory Protocols: CIMMYT Applied Molecular Genetics Laboratory. 3rd ed. CIMMYT, Ciudad de México, México, D.F. 86p.

Cirulli, M. 1975. Il deperimento dell'olivo da *Verticillium dahliae* Kleb. *Italia Agrícola* 112(6): 120-124.

Dhingra, O.D and J.B. Sinclair. 1985. *Basic Plant Pathology Methods*. Boca Raton, Florida, CRC Press. 355 p.

EPPQ quarantine pest. 2003. *Verticillium* spp. on hops. Disponible en: http://www.eppo.org/QUARANTINE/fungi/Verticillium_albo-atrum/VERTSP_ds.pdf. Leído el 10 noviembre 2007.

EPPO quarantine pest. 2007. *Verticillium albo-atrum* and *Verticillium dahliae* on hop. Bulletin 37: 528-535.

FAO. 2010. Estadísticas. Disponible en: <http://faostat.fao.org/site/567/default.aspx#ancor>. Leído el 11 mayo 2010.

Fradin, E.F and B.P.H.J. Thomma. 2006. Physiology and molecular aspects of *Verticillium* wilt diseases caused by *V. dahliae* and *V. albo-atrum*. Molecular Plant Pathology 7 (2): 71-86.

Griffen, M.A., B.W. Bainbridge and J.B. Heale. 1997. Ribosomal, mitochondrial and amplified DNA polymorphisms in *Verticillium albo-atrum* pathogenic to hops, lucerne and other plants. Mycological Research 101 (9): 1085-1091.

Happstadius, I., A. Ljungberg., B. Kristiansson and C. Dixelius. 2003. Identification of *Brassica oleracea* germplasm with improved resistance to *Verticillium* wilt. Plant Breeding 122: 30-34.

Henson, J.M and R. French. 1993. The polymerase chain reaction and plant diagnosis. Annual Review of Phytopathology 31: 81-109

Hoitink, H.A.J and M.S. Krause. 1999. Control of nuisance and detrimental molds (fungi) in mulches and composts. Special Circular Ohio Agricultural Research and Development Center 165: 66-69.

Huisman, O.C and L.J. Ashworth. 1976. Influence of crop rotation on survival of *Verticillium albo-atrum* in soils. Phytopathology 66: 978-981.

Isaac, I. 1953. The spread of diseases caused by a species of *Verticillium*. Annals of Applied Biology 40: 630-638.

Isaac, I. 1967. Speciation in *Verticillium*. Annual Review of Phytopathology 5: 201-222.

Jabnoun-Khiareddine, H., M. Daami-Remadi., K. Hibar., J. Robb and M. El Mahjoub. 2006a. Effect of temperature on *Verticillium* wilts of tomato in Tunisia. Plant Pathology Journal 5(1): 1-6.

Jabnoun-Khiareddine, H., M. Daami-Remadi., K. Hibar., F. Ayed and M. El Mahjoub. 2006b. Pathogenicity of Tunisian isolates of three *Verticillium* species on tomato and eggplant. Plant Pathology Journal 5(2): 199-207.

Jacobsen, B.J., D.H. MacDonald and H.L. Bissonette. 1979. Interaction between *Meloidogyne hapla* and *Verticillium albo-atrum* in the *Verticillium* wilt disease of potato. Phytopathology 69:288-292.

- Karajeh, M.R and S.A. Masoud. 2006. Molecular detection of *Verticillium dahliae* Kleb. in asymptomatic olive trees. *Journal of Phytopathology* 154: 496-499.
- Kareem Al-Taae, A and H. Hazim Al-Taae. 2010. Molecular diagnosis of *Verticillium dahliae* Kleb., the causal agent of *Verticillium* wilt of olive. *Jordan Journal of Agricultural Sciences* 6(1): 1-15.
- Kim, J.T., I.H. Park., H.B. Lee., Y.I. Hahm and S.H. Yu. 2001. Identification of *Verticillium dahliae* and *V. albo-atrum* causing wilt of tomato in Korea. *Plant Pathology Journal* 17(4): 222-226.
- Klosterman, S.J., Z.K. Atallah., G.E. Vallad and K.V. Subbarao. 2009. Diversity, pathogenicity and Management of *Verticillium* species. *Annual Review of Phytopathology* 47: 39-62.
- Lachquer, K and M.H. Sedra. 2002. Characterization of *Verticillium dahliae* Kleb. isolates from *olea europea* using RAPD markers. *Phytopathologia Mediterranea* 41: 170-178.
- Mahuku, G.S., H.W. Platt and P. Maxwell. 1999. Comparison of traditional and polymerase reaction-based assays to detect and identify *Verticillium* wilts pathogens of potato. *Canadian Journal of Plant Pathology* 21: 125-131.
- Masoud, S. A. (2002). Specificity of different PCR primers for *Verticillium dahliae* isolated from olive trees in Jordan. *Mu'tah Lil-Buhuth wad-Dirasat* 17: 89-104.
- Mckeen, C.D and W.B. Mountain. 1960. Synergism between *Pratylenchus penetrans* (Cobb) and *Verticillium albo-atrum* in eggplant wilt. *Canadian Journal of Botany* 38(5): 789-794.
- Mercado-Blanco, J., D. Rodríguez-Jurado, E. Pérez-Artes and R. Jiménez-Díaz. 2001. Detection of the nondefoliating pathotype of *Verticillium dahliae* in infected olive plants by nested PCR. *Plant Pathology* 50: 609-619.
- Mercado-Blanco, J., D. Rodríguez-Jurado, E. Pérez-Artes and R. Jiménez-Díaz. 2002. Detection of the defoliating pathotype of *Verticillium dahliae* in infected olive plants by nested PCR. *European Journal of Plant pathology* 108: 1-13.
- Morera, B., J.I. Páez., M. Vega y F. Montes. 2005. Comparación de métodos de diagnóstico de *Verticillium dahliae* en olivo: aislamiento en medio de cultivo y PCR. *Boletín de Sanidad Vegetal Plagas* 31: 267-275.
- Moukhamedov, R., X. Hu and J. Robb. 1994. Use of polymerase chain reaction-amplified ribosomal intergenic sequences for diagnosis of *Verticillium tricorpus*. *Phytopathology* 84: 256-259.

Nazar, R.N., X. Hu, J. Schmidt, D. Culham and J. Robb. 1991. Potential use of PCR-amplified ribosomal intergenic sequences in the detection and differentiation of *Verticillium* wilt pathogens. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 39: 1-11.

Njoroge, S.M.C., Z. Kabir., F.N. Martin., S.T. Koike., and K.V. Subbarao. 2009. Comparison of crop rotation for *Verticillium* wilt management and effect on *Pythium* species in conventional and organic strawberry production. *Plant Disease* 93: 519-527.

ODEPA. 2010a. Comercio exterior: estadísticas y precios. Disponible en: http://www.odepa.gob.cl/sice/SerieAnualParamsB.action;jsessionid=D91EC9A79E218EC6CF603EE71BB8FD63?rubro=producto&reporte=series_prod. Leído el 23 abril 2010.

ODEPA. 2010b. Estadísticas: frutales país. Disponible en: <http://www.odepa.gob.cl/servlet/articulos.ServletMostrarDetalle;jsessionid=D91EC9A79E218EC6CF603EE71BB8FD63?idcla=12&idn=1738>. Leído el 19 enero 2010.

ODEPA. 2010c. Información territorial: Catastros frutícolas y vitícolas. Disponible en: <http://www.odepa.gob.cl/catastro/ReporteCatastro.action;jsessionid=3240980A7C467C2CFA4A802625ECE670>. Leído el 30 junio 2010.

Otero, L., D. Ducasse and R.N.G. Miller. 2004. Variability in ribosomal DNA genic and spacer regions in *Verticillium dahliae* isolates from different host. *Fitopatología Brasileira* 29: 441-446.

Paplomatas, E.J. 2004. Molecular diagnostics for soilborne fungal pathogens. *Phytopathologia Mediterranea* 43: 213-220.

Patterson, K., J. Burdon and N. Lallu. 2003. Hort16A Kiwifruit: Progress and Issues with Commercialisation. *Acta Horticulturae* 610.

Pegg, G.F and B.L Brady. 2002. *Verticillium* Wilts. CABI Publishing, Oxon, Reino Unido. 552p.

Pérez-Artés, E., M.D. García-Pedrajas., J. Bejarano-Alcázar and R.M. Jiménez-Díaz. 2000. Differentiation of cotton-defoliating and nondefoliating pathotypes of *Verticillium dahliae* by RAPD and specific PCR analyses. *European Journal of Plant Pathology* 106: 507-517.

Plasencia, J and E. Bantari. 1997. Comparison between a culture plate method and an immunoassay to evaluate vascular colonization of potato by *Verticillium dahliae*. *Plant Disease* 81: 53-56.

- Platt, H.W and G. Mahuku. 2000. Detection methods for *Verticillium* species in naturally infested and inoculated soils. *American Journal of Potato Research* 77: 271-274.
- Qin, M.Q., G.E. Vallad, B.M. Wu and K.V. Subbarao. 2006. Phylogenetic analyses of phytopathogenic isolates of *Verticillium* spp. *Phytopathology* 96: 582-592.
- Qin, Q.M., G.E. Vallad and K.V. Subbarao. 2008. Characterization of *Verticillium dahliae* and *V. tricorpus* isolates from Lettuce and Artichoke. *Plant Disease* 92: 69-77.
- Radisek, S., J. Jakse., A. Simoncic and B. Javornik. 2003. Characterization of *Verticillium albo-atrum* field isolates using pathogenicity data and AFLP analysis. *Plant Disease*. 87: 633-638.
- Radisek, S., J. Jakse and B. Javornik. 2006. Genetic variability and virulence among *Verticillium albo-atrum* isolates from hop. *European Journal of Plant Pathology* 116: 301-314.
- Robb, J., R. Moukhamedov., X. Hu., H. Platt and R. Nazar. 1993. Putative subgroups of *Verticillium albo-atrum* distinguishable by PCR based assay. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 43: 423-436.
- Robb, J., X. Hu., H. Platt and R. Nazar. 1994. PCR based assays for the detection and quantification of *Verticillium* species in potato. Pp 83-90. *In* M. Dewey, R. Oliver, and A. Schots (ed.). *Modern assays for plant pathogenic fungi: identification, detection and quantification*. CAB International, The Netherlands. 267p.
- Schall, M. J. 2008. *Verticillium* wilt of *Ailanthus altissima*. Ph. D. dissertation, Pennsylvania State University, College of Agricultural Sciences. Pensilvania, Estados Unidos.
- Schena, L., F. Nigro and A. Ippolito. 2004. Real-time PCR detection and quantification of soilborne fungal pathogens: the case of *Rosellinia necatrix*, *Phytophthora nicotianae*, *P. citrophthora*, and *Verticillium dahliae*. *Phytopathologia Mediterranea* 43: 273-280.
- Subbarao, K.V., Z. Kabir., F.N. Martin and S.T. Koike. 2007. Management of soilborne diseases in strawberry using vegetable rotations. *Plant Disease*. 91: 964-972.
- Talboys, P.W. 1960. A culture medium aiding the identification of *Verticillium albo-atrum* and *Verticillium dahliae*. *Plant Pathology* 9 (2): 57-58.
- Volossiuk, T., J. Robb and R. Nazar. 1995. Direct DNA extraction for PCR-mediated assays of soil organisms. *Applied and Environmental Microbiology* 61: 3972-3976.

Zheng-Guang, Z., C. Rui-Hui., W. Yuan-Chao., W. Kerong and Z. Xiao-Bo. 2005. Molecular detection of *Verticillium albo-atrum* by PCR based on its sequences. *Agricultural Sciences in China* 4 (10): 760-766.

APÉNDICES

Cuadro 3. Valores promedios de conidias (largo y ancho) por especie.

Conidia N°	<i>V. albo-atrum</i> / <i>V. dahliae</i>				Conidia N°	<i>V. albo-atrum</i> / <i>V. dahliae</i>			
	Largo μm		Ancho μm			Largo μm		Ancho μm	
1	7,5	5,0	3,5	2,5	26	3,8	3,8	2,0	1,3
2	4,5	5,5	2,5	1,3	27	1,5	6,3	1,5	1,3
3	7,5	5,0	2,5	1,3	28	3,0	3,8	2,5	2,5
4	4,0	2,5	2,5	1,3	29	2,5	5,0	2,5	2,5
5	6,3	5,0	3,0	2,5	30	6,3	5,0	2,5	2,5
6	5,0	2,5	2,5	1,3	31	3,0	5,0	2,5	2,5
7	6,0	3,0	3,0	1,3	32	5,0	7,5	2,5	3,0
8	5,0	7,5	2,5	2,5	33	4,5	5,0	2,5	2,5
9	2,5	6,3	1,5	2,5	34	7,5	5,0	2,5	1,3
10	5,0	5,0	2,5	2,5	35	8,8	3,8	2,5	1,3
11	7,5	5,0	3,8	2,5	36	4,5	5,0	2,5	1,3
12	2,5	1,3	2,5	1,3	37	4,5	5,0	2,5	1,3
13	3,8	4,5	2,5	2,5	38	2,5	2,5	2,5	2,5
14	2,0	3,8	1,0	2,5	39	2,5	5,0	1,5	1,3
15	3,8	5,0	2,5	1,3	40	5,0	5,0	4,5	1,3
16	2,5	2,5	1,3	1,3	41	5,0	3,8	2,5	2,5
17	2,5	5,0	1,0	1,0	42	4,5	3,8	2,5	2,5
18	3,8	5,5	2,5	2,5	43	5,0	3,8	2,0	1,3
19	3,8	3,8	2,5	1,3	44	7,5	3,8	2,5	1,0
20	5,0	5,0	2,5	1,3	45	2,5	2,5	2,5	1,3
21	5,5	1,3	3,0	1,3	46	2,5	3,8	2,5	1,3
22	5,0	5,0	3,0	1,3	47	5,0	5,0	2,5	1,3
23	2,5	1,3	1,3	1,3	48	5,0	2,5	2,5	2,5
24	3,0	3,0	2,0	1,3	49	6,3	2,5	2,5	2,5
25	5,0	2,5	3,0	2,5	50	2,5	5,0	2,5	2,5
Promedio						4,5	4,1	2,4	1,7

Cuadro 4. Valores promedios de fialides (largo y ancho) por especie.

Fíalide N°	<i>V. albo-atrum / V. dahliae</i>				Fíalide N°	<i>V. albo-atrum / V. dahliae</i>				
	Largo μm		Ancho μm			Largo μm		Ancho μm		
1	62,5	55,0	2,5	2,5	26	52,5	30,0	2,5	2,5	
2	25,0	27,5	2,5	2,5	27	32,5	30,0	2,5	2,5	
3	22,5	20,0	2,5	1,3	28	22,5	12,5	1,3	1,3	
4	17,5	17,5	2,5	2,5	29	22,5	45,0	2,5	2,5	
5	32,5	15,0	2,5	2,5	30	25,0	15,0	2,5	1,3	
6	25,0	45,0	2,5	2,5	31	20,0	37,5	1,3	2,5	
7	27,5	20,0	2,5	2,5	32	37,5	17,5	2,5	1,3	
8	25,0	40,0	2,5	2,5	33	20,0	12,5	1,3	1,3	
9	27,5	45,0	2,5	2,5	34	22,5	12,5	2,5	1,3	
10	32,5	12,5	2,5	2,5	35	17,5	15,0	1,3	1,3	
11	37,5	30,0	2,5	2,5	36	22,5	15,0	2,5	1,3	
12	50,0	30,0	2,5	2,5	37	30,0	20,0	2,5	2,5	
13	30,0	25,0	2,5	1,3	38	32,5	25,0	2,5	2,5	
14	35,0	25,0	2,5	2,5	39	25,0	35,0	1,3	2,5	
15	15,0	20,0	1,3	2,5	40	30,0	50,0	2,5	2,5	
16	27,5	20,0	2,5	2,5	41	27,5	25,0	2,5	2,5	
17	35,0	12,5	2,5	1,3	42	25,0	20,0	2,5	2,5	
18	25,0	50,0	2,5	2,5	43	40,0	37,5	2,5	2,5	
19	20,0	12,5	1,3	1,3	44	27,5	35,0	0,5	2,5	
20	32,5	25,0	2,5	2,5	45	40,0	22,5	2,5	2,5	
21	27,5	30,0	2,5	2,5	46	30,0	55,0	2,5	2,5	
22	32,5	30,0	2,5	2,5	47	20,0	30,0	1,3	2,5	
23	35,0	47,5	2,5	2,5	48	32,5	15,0	2,5	1,3	
24	45,0	17,5	2,5	1,3	49	32,5	55,0	2,5	2,5	
25	35,0	30,0	2,5	2,5	50	35,0	30,0	2,5	2,5	
Promedio					30,1	28,0	2,3	2,2		

Cuadro 5. Temperaturas promedios en *V. albo-atrum*.

Tiempo (días)	Temperaturas promedio					
	5	10	15	20	25	30
0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
2	0,0	1,7	2,1	4,1	3,5	0,0
4	2,0	5,3	10,1	11,0	10,3	0,0
6	4,0	8,8	14,8	17,0	15,9	0,8
8	6,4	11,7	20,5	23,4	21,7	1,2
10	8,4	15,3	24,8	29,2	27,5	1,6
12	11,1	18,2	29,0	33,7	31,5	2,1
14	13,4	21,4	32,2	38,9	35,6	2,8
16	15,8	23,4	35,5	44,6	39,7	3,4
18	18,1	27,0	38,2	49,6	44,3	3,9

Cuadro 6. Temperaturas promedios de *V. dahliae* durante 18 días.

Tiempo (días)	Temperaturas promedio <i>V. dahliae</i>					
	5	10	15	20	25	30
0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
2	0,0	2,8	4,3	4,3	5,1	4,3
4	0,0	4,6	7,4	9,9	12,5	6,0
6	1,9	7,5	14,5	17,9	19,2	7,0
8	3,6	10,2	22,0	24,6	27,1	8,4
10	5,0	14,1	27,2	30,9	33,7	10,6
12	6,2	16,5	31,1	37,1	38,9	12,2
14	7,7	19,1	34,7	41,9	44,2	13,9
16	10,1	21,5	38,2	47,2	49,2	15,2
18	12,2	24,7	42,3	51,5	54,0	16,3

Cuadro 7. Promedio, desviación estándar y comparación múltiple SNK de *V. albo-atrum* y *V. dahliae* a temperaturas entre los 5 y 30°C.

T°	Promedio		Desv. Estandar		P	SNK ¹	
	<i>V. albo-atrum</i>	<i>V. dahliae</i>	<i>V. albo-atrum</i>	<i>V. dahliae</i>			
5	18,050	12,150	0,832	1,780	0,000	a	b
10	26,950	24,700	1,141	1,378	0,001	a	b
15	38,200	42,250	1,317	2,850	0,001	b	a
20	49,550	51,500	3,586	5,126	0,337	a	a
25	44,300	54,000	6,726	6,325	0,004	b	a
30	3,900	16,250	0,394	2,850	0,000	b	a

¹ Letras distintas entre categorías señalan diferencias estadísticamente significativas según prueba de comparación múltiple de SNK ($p \leq 0,05$).

Cuadro 8. Índice de severidad por tratamiento al día 60.

Planta N°	Tratamiento 1 (inoculadas)	Tratamiento 2 (testigo)
1	3	0
2	2	1
3	3	0
4	2	1
5	5	0
6	4	1
7	3	1
8	4	1
9	4	1
10	4	0
11	3	0
12	3	1
13	4	0
14	4	1
15	3	1
16	3	0
17	2	0
18	1	1
19	3	0
20	4	0
Promedio	3,2	0,5

Cuadro 9. Análisis ANDEVA y comparación múltiple SNK de Índice de severidad.

Tratamiento	Promedio	Desv. Est	P	SNK
1	3,2	0,9515	0,000	a
2	0,5	0,5130		b